

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3974619号  
(P3974619)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 G O 1 N 33/53 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00  
 G O 1 N 33/53  
 A 6 1 K 37/02  
 A 6 1 K 31/7088  
 A 6 1 P 43/00

D

請求項の数 9 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-566302 (P2004-566302)  
 (86) (22) 出願日 平成15年12月26日(2003.12.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2003/016956  
 (87) 国際公開番号 W02004/062693  
 (87) 国際公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)  
 審査請求日 平成18年11月6日(2006.11.6)  
 (31) 優先権主張番号 特願2003-3967 (P2003-3967)  
 (32) 優先日 平成15年1月10日(2003.1.10)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 802000019  
 株式会社新潟ティーエルオー  
 新潟県新潟市五十嵐2の町8050番地  
 (74) 代理人 100088546  
 弁理士 谷川 英次郎  
 (72) 発明者 埴 晴雄  
 新潟県新潟市西大畑町5214番地 西大  
 畑職員宿舎RA205号  
 審査官 川口 裕美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子治療用ベクター及び該遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物中又は培養細胞中の目的タンパク質の定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳類細胞用発現ベクターに、配列番号1に示されるアミノ酸配列から成るペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産させることができる遺伝子治療用ベクター。

【請求項2】

前記配列番号1に示されるアミノ酸配列から成るペプチド領域は、前記目的タンパク質領域のC末端に結合される請求項1記載のベクター。

【請求項3】

前記目的タンパク質が、サイトカイン若しくはサイトカインに免疫グロブリンの定常領域を付加した融合タンパク質、成長因子、ホルモン若しくは細胞接着因子又はこれらのレセプターである請求項1又は2記載のベクター。

【請求項4】

前記サイトカイン又はそのレセプターが、インターフェロン及びそのレセプター、CTLA4、インターロイキン及びそのレセプターから成る群から選ばれる請求項3記載のベクター。

【請求項5】

請求項1ないし4のいずれか1項に記載の遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試料中の、配列番号1に示されるアミノ酸配列

10

20

から成るペプチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法。

【請求項 6】

前記被検試料が、前記遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物から採取されたものである請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記被検試料が、血液試料である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列から成るペプチドから成る、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。 10

【請求項 9】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列から成るペプチドから成る、哺乳動物体内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体内又は培養細胞内で生産された目的タンパク質を簡便に定量することができる、生体内で目的タンパク質を生産するための遺伝子治療用ベクターに関する。

【背景技術】

20

【0002】

患者の体内で目的のタンパク質を生産させる遺伝子治療を行った際、目的のタンパク質の血中濃度はその蛋白のELISA法など、測定法が確立している場合は可能であるが、確立していない場合は濃度測定ができない。そこで、標識蛋白を用いて、その蛋白濃度を測定するアッセイ法が実用化され販売されている。しかし、この測定感度は低く、遺伝子治療における血中濃度測定として確立した方法はない。文献(Treatment of Murine Lupus with cDNA encoding IFN- $\gamma$  R/Fc, The Journal of Clinical Investigation, July 2000, volume 106, Number 2 p207-215)では目的のタンパク質を測定せずに影響を受けるタンパク質を定量化して間接的に目的のタンパク質の発現を証明している。これは血中濃度測定の難しさを示していると考えられる。 30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的は、遺伝子治療を行った際の目的タンパク質の血中濃度を高感度にモニターでき、標識に起因する不所望の生理作用や抗原抗体反応がほとんど引き起こされない、遺伝子治療用ベクターを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本願発明者らは、鋭意研究の結果、遺伝子治療により体内で生産させるべき目的タンパク質と、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだベクターで遺伝子治療を行うことにより、上記グルカゴンペプチドを標識として目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することができ、かつ、標識ペプチドに起因する不所望な生理作用の発現や免疫反応の誘起がほとんどないことを見出し、本発明を完成した。 40

【0005】

すなわち、本発明は、哺乳類細胞用発現ベクターに、配列番号1に示されるアミノ酸配列から成るペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産させることができる遺伝子治療用ベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試 50

料中の、配列番号1に示されるアミノ酸配列から成るペプチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養哺乳動物細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法を提供する。さらに、本発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列から成るペプチドから成る、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤を提供する。

【発明の効果】

【0006】

本発明により、標識ペプチドは生理作用を持つことなく、目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することを可能にする遺伝子治療用ベクターが初めて提供された。グルカゴンのC端側19-29は、それ自体生理作用を有さず、各種哺乳動物においてよく保存されているので、免疫反応を実質的に誘起せず、それでいて市販の免疫測定キットを用いて高感度に免疫測定することにより定量することが可能である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明のベクターにより、目的タンパク質と融合されて発現される、「グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド」とは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドである。この「グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド」は、目的タンパク質の標識として用いられるので、以下、便宜的に「グルカゴン由来標識ペプチド」と呼ぶことがある。

20

【0008】

本発明のベクターには、グルカゴン由来標識ペプチド領域と、目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸が組み込まれている。

【0009】

本発明に用いられる哺乳類細胞用発現ベクターは、遺伝子治療の分野において周知であり、哺乳類細胞用発現ベクターであれば限定されない。本発明の特徴は、目的タンパク質の標識としてのグルカゴン由来標識ペプチド領域を、目的タンパク質と融合させて発現させる点にあり、哺乳類細胞用発現ベクターは、何ら限定されるものではなく、遺伝子治療の分野で用いられている公知のいずれの哺乳類細胞用発現ベクターをも用いることができる。プラスミドベクターでもウイルスベクターでもよいが、安全性の観点からプラスミドベクターが好ましい。種々の哺乳類細胞用発現ベクターが周知であり、また、市販されており、これらの周知又は市販のベクターを好ましく用いることができる。周知又は市販ベクターの例として、pCAGGS (Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 1991 Dec.15,108(2)p193-P199)、遺伝子地図を図4に、その塩基配列を配列表の配列番号3に示す)、プロメガ社のpCIベクター、pSIベクター及びpTARGETベクター並びにインビトロジェン社のpcDNA5/T0等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

30

【0010】

遺伝子治療により体内で生産させようとする目的タンパク質は、何ら限定されるものではなく、インターフェロン、インターロイキン及びCTLA4のような種々のサイトカイン、成長因子、インスリン等のホルモン及び細胞接着因子等並びにこれらのレセプターを例示することができる。また、任意の抗原タンパク質を体内で生産させ、遺伝子ワクチンとすることもできる。また、目的タンパク質自体が融合タンパク質であってもよい。例えば、Fcレセプターとの結合が求められる所望のサイトカインの一端に、免疫グロブリン、好ましくはIgG、特にIgG1の定常領域(Fc)を融合し、Fcレセプターとの結合性を高めたものを目的タンパク質とすることもできる(下記実施例1~4参照)。IgGのFc領域をコードする核酸の塩基配列は、周知であり、例えば、ヒトのIgG Fc領域をコードする核酸の塩基配列は例えばGenBank Accession No. BC020823等に記載されており、ラットのIgG Fc領域をコードする核酸の塩基配列は本願の図1ないし図3等に示されている。

40

【0011】

50

本発明のベクターは、目的タンパク質と、上記標識ペプチドとの融合タンパク質をコードする核酸を、哺乳類細胞用発現ベクターのクローニングサイトに挿入することにより得られる。なお、標識ペプチドは、目的タンパク質の一端、特にC末端に融合させることが好ましい。

#### 【0012】

遺伝子治療は、本発明の遺伝子治療用ベクターを、哺乳動物に投与することにより行うことができる。投与経路は、静脈注射や筋肉内注射のような非経口投与が好ましい。ベクターの投与量は、目的タンパク質の性質や治療すべき疾患の種類及び程度等に応じて適宜設定することができるが、体重1kg当りのベクターの投与量は、通常、1mg~10mg程度、好ましくは2mg~4mg程度である。製剤としては、例えば、遺伝子治療用ベクターをリンゲル液に溶解した溶液を注射液として用いることができる。これに医薬製剤の分野で周知の注射剤用添加剤を添加することも可能である。あるいは、本発明の遺伝子治療用ベクターは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に投与することもできる。すなわち、患者のリンパ球や骨髄細胞等の細胞を体外に取り出して培養し、培養細胞に遺伝子ベクターを投与し、目的タンパク質の生産能を獲得した細胞を再び患者に戻す遺伝子治療があるが、本発明の遺伝子治療用ベクターは、このような培養哺乳動物細胞に投与することもできる。あるいは、遺伝子治療用ベクターの治療効果をインビトロで調べるため等の実験において培養される哺乳動物細胞に投与することもできる。

10

#### 【0013】

遺伝子治療において、体内に導入されたベクターにより上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合タンパク質が生産される。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、該培養細胞内で上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合タンパク質が生産される。目的タンパク質は、標識ペプチドと融合しているため、目的タンパク質の濃度は、グルカゴン由来標識ペプチドの濃度を測定することにより測定することができる。なお、本発明で用いられるグルカゴン由来標識ペプチドを免疫測定するキット（グルカゴン由来標識ペプチドを抗原として得られる抗体を含む）が市販されている（第一ラジオアイソトープ研究所製隣グルカゴンRIAキット等）ので、このような市販の免疫測定用キットを用いて容易に測定することができる。

20

#### 【0014】

グルカゴン由来標識ペプチドを定量する被検試料は、本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された個体由来の各種体液や組織等又はそれらの希釈物であり、好ましくは、全血、血清若しくは血漿又はそれらの希釈物のような血液試料である。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、培養細胞のホモジネートや培養上清等である。

30

#### 【実施例】

#### 【0015】

##### 実施例1、比較例1

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaagtgagagcgccgcccgtgccagaaactgtg-3'と5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttaccggagagtgaggagact-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、さらにそのPCR産物を300倍希釈したものを鋳型として、5'-gagaattcatttaaagtgagagcgccgcccgtgccagaaactgtg-3'と5'-gagagagaattctcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、増幅産物を、EcoRIを用いて上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのクローニングサイトに組み込んだ。これにより、SwaIとNotIの制限酵素部位の入ったpCAGGS-IgG-glu19-29（免疫グロブリンG1(IgG1)のFc領域をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合された核酸断片がpCAGGSのEcoRI部位に挿入されたもの）が得られた。

40

#### 【0016】

次に、ラット心筋炎の心臓のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaagtattctgctgg

50

tggtcctgatg-3'と5'-gcagcatcgcgccgcttcttctctgtcatcatggagaaa-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、先に作成したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

#### 【0017】

これにより、上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に、配列表の配列番号2に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有するDNA断片が挿入された、本発明のベクターを作製した（実施例1）。なお、配列番号2を他の情報と共に図1ないし図3に示す。図1ないし図3に示されるように、挿入した核酸断片は、両端にEcoRI部位を有し、インターフェロンレセプター（IFN $\alpha$ ）タンパク質と、免疫グロブリンG1（IgG1）のFc領域の融合タンパク質をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合されたもの（INF $\alpha$ -IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>）である。

10

#### 【0018】

グルカゴン由来標識ペプチドを含まないプラスミドベクター（比較例1）と、上記のように作成したグルカゴン由来標識ペプチドを含む本発明のプラスミドベクター（実施例1）を、それぞれ7匹のラットの尾静脈から急速静脈注射し、遺伝子治療を行った。注射液の組成は、一匹あたり800 $\mu$ gのプラスミドを20mlのリンゲル液に溶解したものであった。注射後、経時的に血液を採取し、採血して得た1~10 $\mu$ lの血漿を100~1000倍希釈し、市販のRIAキット（第一ラジオアイソトープ研究所製豚グルカゴンRIAキット等）を用いて、該キットの添付文書に従ってグルカゴン由来標識ペプチドの濃度、ひいては、目的タンパク質（本実施例では、IFN $\alpha$ /IgG1Fc融合タンパク質）の濃度を測定した。すな

20

#### 【0019】

図5は血中濃度の測定結果である。実施例1では、静脈注射後1日目2870 $\pm$ 1062ng/ml（平均 $\pm$ 標準偏差）、3日目1440 $\pm$ 334ng/ml、7日目1120 $\pm$ 433ng/ml、16日目281 $\pm$ 162ng/ml、との結果が得られ、全例で測定可能であった。一方、グルカゴンペプチドを含まないプラスミドベクターでの遺伝子治療（比較例1）では同様な検査ですべて感度以下で

30

#### 【0020】

図6はプラスミド静脈注射4, 8, 12時間後の血糖値及び上記と同様にRIA測定法で検査した蛋白血中濃度の値である。実施例1では、血中濃度は4時間後2815 $\pm$ 2318ng/ml、8時間後6061 $\pm$ 2789ng/ml、12時間後5752 $\pm$ 2270ng/mlを示し、最大血中濃度を示した8-12時間後の血糖は、8時間後89.3 $\pm$ 15.1mg/dl（実施例1）vs81.8 $\pm$ 7.5mg/dl（比較例1）、12時間後63.5 $\pm$ 5.7mg/dl（実施例1）vs71.4 $\pm$ 6.9mg/dl（比較例1）と差はなかった。

#### 【0021】

以上の結果から、本発明のベクターを用いることにより、ベクター投与の数十日後まで、極少量の血漿サンプルから、目的タンパク質の血中濃度を十分測定することが可能であることが明らかになった。

40

#### 【0022】

実施例2、比較例2

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcattttaaaggccttgtcttggactccagagg-3'と5'-gcagcatcgcgccgcttctgaatctggcatggttctgg-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、実施例1記載の方法で作製したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

#### 【0023】

これにより、図7ないし9及び配列番号4に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す

50

)を有するラットCTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>(ラットCTLA4コード領域の下流にラットIgG Fcコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクター-pCAGGSのEco RI部位に挿入された、ラット細胞内でCTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例2)。比較のため、CTLA4コード領域を含まないIgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>コード領域のみを挿入した組換えベクターも作製した(比較例2)。

【0024】

心臓移植後のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、移植心臓の生着日数も調べた。

【0025】

結果を図10及び図11に示す。図10に示されるように、実施例2では、CTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図7のように推移した。つまり前値は100倍希釈ではグルカゴンが測定不能であったが、1日目に急激に上昇し、5000ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した105日後まで、1000ng/mlを越えるような蛋白濃度を示した。また、図11に示されるように、実施例2では、10匹中1匹が14日目に拒絶されたが、残りの9匹はすべて評価した105日まで生着していた。CTLA4を含まないpCAGGS-SP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>で治療した群(比較例2)では、5匹中1匹が5日目に、1匹が6日目に、3匹が7日目に拒絶された。これは有意にpCAGGS-CTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性を示している。

【0026】

実施例3、比較例3

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcattttaaattggcactctgggtgactgcagtc-3'と5'-gcagcatcgcgcccgctggccatagcggaaaagtgtgctt-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を実施例1記載の方法で作製したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

【0027】

これにより、図12ないし14及び配列番号5に示す塩基配列(制限酵素部位も含めて示す)を有するラットIL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>(ラットインターロイキン13(IL13)コード領域の下流にラットIgG Fcコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクター-pCAGGSのEco RI部位に挿入された、ラット細胞内でIL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例3)。比較のため、IL13コード領域を含まないSP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>コード領域(配列番号6並びに図15及び図16)のみを挿入した組換えベクターも作製した(比較例3)。

【0028】

自己免疫性心筋炎ラット(A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction.

Clinical Immunology and Immunopathology, November 1990, volume 57, p250-262.)の

ラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与16日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。

【0029】

結果を図17及び図18に示す。IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図17のように推移した。つまり、1日目に2000ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した16日後まで、約8ng/mlの蛋白濃度を示した。また、図18に示すように、本発明の遺伝子治療用ベクターであるpCAGGS-IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>(IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を挿入したベクター-pCAGGS)を投与した群では、IL13を含まないpCAGGS-SP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を投与した群に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS-IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性が示された。

【0030】

実施例4、比較例4

マウスのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaaatggaaatctgctggggaccctac-3'と5'-gcagcatcgcgccgcttggctcttctggaagtagaactt-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を実施例1記載の方法で作製したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

【0031】

これにより、図19ないし21及び配列番号7に示す塩基配列(制限酵素部位も含めて示す)を有するラットIL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>(ラットインターロイキン1レセプター-アンタゴニストコード領域の下流にラットIgG Fcコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でIL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例4)。

10

【0032】

自己免疫性心筋炎ラット(A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, November 1990, volume 57, p250-262.)のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与16日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。比較のため、上記比較例3のベクターも投与した(比較例4)。

【0033】

結果を図22及び図23に示す。図22に示すように、実施例4では、IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図22のように推移した。つまり、1日目に2000ng/mlを越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した16日後まで、約20ng/mlの蛋白濃度を示した。また、図23に示すように、実施例4では比較例4に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS-IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>治療の有効性が示された。

20

【0034】

実施例5

SwaIとNotIの制限酵素部位の入ったpCAGGS-glu19-29を作るために、5'-gagaattcatttaaatgagagcgccgccccgggtaaagcccaagattttgtgcagtggttg-3'と5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3'のプライマーのみでPCRを行い、EcoRIを用いて、pCAGGSのクローニングサイトに組み込んだ。

30

【0035】

次にCos7細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaatgacttccaagctggccgtggct-3'と5'-gcagcatcgcgccgctgaattctcagccctcttcaaaa-3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、先に作成したpCAGGS-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

【0036】

これにより、図24及び配列番号8に示す塩基配列を有するヒトIL8-グルカゴン<sup>19-29</sup>(ヒトインターロイキン8コード領域の下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でIL8-グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例5)。

40

【0037】

ラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、1日後に採血し、血中濃度を測定した。また、同じ試料中のヒトIL-8の濃度も定量した。ヒトIL-8の定量は、BIOSOURCE社製(Nivelles, Belgium)、IL-8 EASIAキットを用いてそのプロトコールに従って行った。

【0038】

結果を図25に示す。図25に示すごとく、両者のモル濃度はほぼ一致し、グルカゴン<sup>19-29</sup>の標識ペプチドを用いた方法の正確性が証明された。

【図面の簡単な説明】

50

## 【0039】

【図1】 図1は、実施例1で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

【図2】 図2は、図1の続きを示す図である。

【図3】 図3は、図2の続きを示す図である。

【図4】 図4は、実施例1～5で用いた哺乳動物用発現ベクターであるpCAGGSの遺伝子地図である。

【図5】 図5は、実施例1における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

10

【図6】 図6は、実施例1において測定された、本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の目的タンパク質の血中濃度並びに本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合及びグルカゴン由来標識ペプチドを融合していない目的タンパク質をコードする核酸を挿入したベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の血糖値の経時変化を示す図である。

【図7】 図7は、実施例2で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

【図8】 図8は、図7の続きを示す図である。

【図9】 図9は、図8の続きを示す図である。

【図10】 図10は、実施例2における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

20

【図11】 図11は、実施例2及び比較例2における、ラットの移植心臓の生着日数を示す図である。

【図12】 図12は、実施例3で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

【図13】 図13は、図12の続きを示す図である。

【図14】 図14は、図13の続きを示す図である。

【図15】 図15は、比較例3で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

30

【図16】 図16は、図15の続きを示す図である。

【図17】 図17は、実施例3における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

【図18】 図18は、実施例3及び比較例3における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

【図19】 図19は、実施例4で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

【図20】 図20は、図19の続きを示す図である。

【図21】 図21は、図20の続きを示す図である。

40

【図22】 図22は、実施例4における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

【図23】 図23は、実施例4及び比較例4における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

【図24】 図24は、実施例5で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

【図25】 図25は、実施例5における、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度と、ヒトインターロイキン8を測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との相関関係を示す図である。

50

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> NIIGATA TLO CORPORATION  
 <120> Vector for gene therapy and method for quantifying target protein in mammal  
 or cultured cell to which the vector for gene therapy was administered  
 <130> 03PF275-PCT  
 <150> JP 2003-3967  
 <151> 2003-01-10  
 <160> 24 10  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> oligopeptide encoding C19-29 region of glucagon of human, mouse or rat  
 <400> 1  
 Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 1 5 10  
 <210> 2 20  
 <211> 1471  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(1461)  
 <223> DNA insert encoding rat IFN-r receptor, rat IgG Fc region and glucagon C1  
 9-29  
 region  
 <400> 2 30  
 gaattcatitt aa atg att ctg ctg gtg gtc ctg atg ctg tct gcg gag atc 51  
 Met Ile Leu Leu Val Val Leu Met Leu Ser Ala Glu Ile  
 1 5 10  
 ggg agt gga gct ttg atg agc acc gag gat cct aag ccg ccc tcg gtg 99  
 Gly Ser Gly Ala Leu Met Ser Thr Glu Asp Pro Lys Pro Pro Ser Val  
 15 20 25  
 cct gcg cca aca aat gtt cta att acg tcc tat gac ttg aac cct gtc 147  
 Pro Ala Pro Thr Asn Val Leu Ile Thr Ser Tyr Asp Leu Asn Pro Val  
 30 35 40 45  
 gta cat tgg aag cac cag aac gtg tcg cag gct gcc gtc ttc act gta 195 40  
 Val His Trp Lys His Gln Asn Val Ser Gln Ala Ala Val Phe Thr Val  
 50 55 60  
 cag gta aag atg tat cca gaa tac tgg act gat gcc tgc acc aac att 243  
 Gln Val Lys Met Tyr Pro Glu Tyr Trp Thr Asp Ala Cys Thr Asn Ile  
 65 70 75  
 gcc cat cat tat tgt aat atc tac aaa cac att tcc tat cct gac tca 291  
 Ala His His Tyr Cys Asn Ile Tyr Lys His Ile Ser Tyr Pro Asp Ser  
 80 85 90  
 tct gcc tgg gcc aga gtt aag gcc aag gtt gga caa aga gaa tct gcc 339  
 Ser Ala Trp Ala Arg Val Lys Ala Lys Val Gly Gln Arg Glu Ser Ala 50

95	100	105		
tat gcg cag tca gaa gag ttt att atg tgc cga aag ggg aag gtt gga			387	
Tyr Ala Gln Ser Glu Glu Phe Ile Met Cys Arg Lys Gly Lys Val Gly				
110	115	120	125	
ccg cct ggc ctg gac atc gga agg aag gaa gat cag ctg att gtc cac			435	
Pro Pro Gly Leu Asp Ile Gly Arg Lys Glu Asp Gln Leu Ile Val His				
	130	135	140	
ata ttt cac cct aag gtc aat gtg agt cag gaa acc atg ttt ggt gac			483	
Ile Phe His Pro Lys Val Asn Val Ser Gln Glu Thr Met Phe Gly Asp				
	145	150	155	10
gga aat acc tgt tac aca ttc gac tac act gtg ttt gtg aaa cat tac			531	
Gly Asn Thr Cys Tyr Thr Phe Asp Tyr Thr Val Phe Val Lys His Tyr				
	160	165	170	
agg agt ggg gag atc cta cat aca gaa cat agc gtc cta aaa gaa gat			579	
Arg Ser Gly Glu Ile Leu His Thr Glu His Ser Val Leu Lys Glu Asp				
	175	180	185	
tgt agc gaa act ctg tgt gag tta aac atc tca gtg tcc acg ctg aat			627	
Cys Ser Glu Thr Leu Cys Glu Leu Asn Ile Ser Val Ser Thr Leu Asn				
190	195	200	205	
tcc aat tac tgt gtt tca gta gtt gga aag tcg tct ttc tgg caa gtt			675	20
Ser Asn Tyr Cys Val Ser Val Val Gly Lys Ser Ser Phe Trp Gln Val				
	210	215	220	
aat aca gaa aca tca aaa gac gcc tgt atc ccc ttt ctc cat gat gac			723	
Asn Thr Glu Thr Ser Lys Asp Ala Cys Ile Pro Phe Leu His Asp Asp				
	225	230	235	
aga gaa gaa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag			771	
Arg Glu Glu Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys				
	240	245	250	
cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc			819	
Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro				30
	255	260	265	
cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc acg			867	
Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr				
270	275	280	285	
tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc			915	
Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser				
	290	295	300	
tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca cca			963	
Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro				
	305	310	315	40
gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc			1011	
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile				
	320	325	330	
ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc			1059	
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr				
	335	340	345	
agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa			1107	
Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu				
350	355	360	365	
ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag gaa			1155	50

Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu		
370	375	380
gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc	1203	
Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe		
385	390	395
tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag	1251	
Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln		
400	405	410
gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt tac	1299	
Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr		10
415	420	425
ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga	1347	
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly		
430	435	440
445		
aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat	1395	
Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His		
450	455	460
act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg	1443	
Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val		
465	470	475
cag tgg ttg atg aat acc tgagaattct	1471	
Gln Trp Leu Met Asn Thr		20
480		
<210> 3		
<211> 4790		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> DNA sequence of artificial expression vector pCAGGS		
<400> 3		30
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60	
gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	120	
ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180	
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240	
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	300	
cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360	
tattagtcac cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc	420	
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca	480	
gcatgggggg cggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgagggggc	540	
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt	600	40
tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc	660	
gggagtcgct gcgttgccct cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc	720	
ccggctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc ctctctctcc	780	
gggctgtaat tagcgttgg ttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag	840	
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg	900	
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gccgcgctg cccggcggct gtgagcgtg	960	
cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc	1020	
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg	1080	
tgggggggtg agcagggggg gtgggcgcgg cggctcgggct gtaaccccc cctgcacccc	1140	
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc	1200	50

gcggggctcg	ccgtgccggg	cggggggtgg	cggcaggtgg	gggtgccggg	cggggcgggg	1260	
ccgcctcggg	ccggggaggg	ctcgggggag	gggcgcggcg	gccccggagc	gccggcggct	1320	
gtcagggcgc	ggcgagccgc	agccattgcc	ttttatggta	atcgtgcgag	agggcgcagg	1380	
gacttccttt	gtcccaaatc	tggcggagcc	gaaatctggg	aggcgcggcc	gcacccctc	1440	
tagcgggcgc	gggcaagcg	gtgcggcgcc	ggcaggaagg	aaatgggcgg	ggagggcctt	1500	
cgtgcgtcgc	cgcgccgccc	tcccctctc	catctccagc	ctcggggctg	ccgcaggggg	1560	
acggctgcct	tcggggggga	cggggcaggg	cggggttcgg	ctctggcgt	gtgaccggcg	1620	
gctctagagc	ctctgctaac	catgttcatt	ccttcttctt	tttctacag	ctcctgggca	1680	
acgtgctggt	tgttgtgtg	tctcatcatt	tggcaaaga	attcctcgag	gaattcactc	1740	
ctcaggtgca	ggctgcctat	cagaaggtgg	tggctggtgt	ggccaatgcc	ctggctcaca	1800	10
aataccactg	agatcttttt	ccctctgcca	aaaattatgg	ggacatcatg	aagccccttg	1860	
agcatctgac	ttctggctaa	taaaggaaat	ttatcttcat	tgcaatagtg	tgttggaatt	1920	
ttttgtgtct	ctcactcgga	aggacatatg	ggagggcaaa	tcaattaaaa	catcagaatg	1980	
agtatttggg	ttagagtttg	gcaacatatg	ccatatgctg	gctgcatga	acaaaggtgg	2040	
ctataaagag	gtcatcagta	tatgaaacag	ccccctgctg	tccattcctt	attccataga	2100	
aaagccttga	cttgaggtta	gatttttttt	atattttggt	tgtgttatt	ttttcttta	2160	
acatccctaa	aatcttctct	acatgtttta	ctagccagat	tttctctct	ctcctgacta	2220	
ctcccagtca	tagctgtccc	tcttctctta	tgaagatccc	tcgacctgca	gcccaagctt	2280	
ggcgtaatca	tggctatagc	tgtttcctgt	gtgaaatgt	tatccgctca	caattccaca	2340	
caacatacga	gccggaagca	taaagtgtaa	agcctggggg	gcctaataag	tgagctaact	2400	20
cacattaatt	gcgttgcgct	cactgcccgc	tttccagtcg	gaaacctgt	cgtgccagcg	2460	
gatccgcatc	tcaattagtc	agcaaccata	gtcccggccc	taactccgcc	catcccggcc	2520	
ctaactccgc	ccagttccgc	ccattctccg	ccccatggct	gactaatctt	ttttatttat	2580	
gcagaggccg	aggccgcctc	ggcctctgag	ctattccaga	agtagtgagg	aggctttttt	2640	
ggaggcctag	gcttttgcaa	aaagctaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttacaaat	2700	
aaagcaatag	catcacaat	ttcacaata	aagcattttt	ttactgcat	tctagtgtg	2760	
gtttgtccaa	actcatcaat	gtatcttatc	atgtctggat	ccgctgcat	aatgaatcgg	2820	
ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttctt	cgctcactga	2880	
ctcgtctgcg	tcggtcgttc	ggctgcggcg	agcggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	2940	
acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	3000	30
aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	gctggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	3060	
tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcaaggtgg	cgaaacccga	caggactata	3120	
aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	3180	
gcttaccgga	tacctgtccg	ctttctctcc	ttcgggaagc	gtggcgttt	ctcaatgctc	3240	
acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	3300	
acccccggt	cagcccggacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaacct	3360	
ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	3420	
gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtgggtggcct	aactacggct	acactagaag	3480	
gacagtattt	ggatctgctg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcgaaaaaa	gagttggtag	3540	
ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	ccaccgctgg	tagcgggtgt	ttttttgttt	gcaagcagca	3600	40
gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	3660	
cgctcagttg	aacgaaaact	cacgtaaggt	gattttggct	atgagattat	caaaaaggat	3720	
cttcacctag	atcctttttaa	attaaaaatg	aagtttttaa	tcaatctaaa	gtatataatga	3780	
gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	3840	
tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	3900	
gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgca	gacccacgct	caccggctcc	3960	
agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	4020	
tttatccgcc	tccatccagt	ctatfaattg	tggccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	4080	
agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	tgctacaggg	atcgtgggtg	cacgctcgtc	4140	
gtttggtatg	gcttcatcca	gctccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	4200	50

```

catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttggtc gaagtaagtt 4260
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 4320
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380
tatgcccga ccgagttgct cttgccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 4440
cagaacttta aaagtgtctc tcatggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 4500
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 4560
atcttttact ttaccagcgg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 4620
aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 4680
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 4740
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 4790
<210> 4
<211> 1233
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CDS
<222> (13)..(1224)
<223> DNA insert encoding rat CTLA4, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 regi
on
<400> 4 20
gaattcattt aa atg gct tgt ctt gga ctc cag agg tac aaa act cac ctg 51
Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu
1 5 10
cag ctg cct tct agg act tgg cct ttt gga gtc ctg ctt tct ctt ctc 99
Gln Leu Pro Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu
15 20 25
ttc atc cca atc ttc tct gaa gcc ata caa gtg acc caa cct tca gtg 147
Phe Ile Pro Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val
30 35 40 45
gtg ttg gcc agc agc cac ggt gtc gcc agc ttt cca tgt gaa tat gca 195 30
Val Leu Ala Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala
50 55 60
tct tca cac aac act gat gag gtc cgg gtg acg gtg ctg cgg cag aca 243
Ser Ser His Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr
65 70 75
aat gac caa gtg aca gag gtc tgt gcc acg aca ttc aca gtg aag aac 291
Asn Asp Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn
80 85 90
acg ttg ggc ttc cta gat gac ccc ttc tgc agt ggt acc ttt aat gaa 339
Thr Leu Gly Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu
95 100 105
agc aga gtg aac ctc acc atc caa gga ctg agg gct gct gac acc gga 387
Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly
110 115 120 125
ctg tac ttc tgc aag gtg gaa ctc atg tac cca ccg cca tac ttt gtg 435
Leu Tyr Phe Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val
130 135 140
ggc atg ggc aac ggg acc cag att tat gtc atc gat cca gaa cca tgc 483
Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys
145 150 155

```

cca gat tca gac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc	531	
Pro Asp Ser Asp Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys		
160 165 170		
aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc	579	
Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe		
175 180 185		
ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc	627	
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val		
190 195 200 205		
acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc	675	10
Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe		
210 215 220		
agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca	723	
Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro		
225 230 235		
cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc	771	
Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro		
240 245 250		
atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc	819	20
Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val		
255 260 265		
acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc	867	
Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro		
270 275 280 285		
gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag	915	
Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys		
290 295 300		
gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc	963	
Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly		
305 310 315		30
ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca	1011	
Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro		
320 325 330		
cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt	1059	
Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser		
335 340 345		
tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag	1107	
Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln		
350 355 360 365		
gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac	1155	40
Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His		
370 375 380		
cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt	1203	
His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe		
385 390 395		
gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc	1233	
Val Gln Trp Leu Met Asn Thr		
400		
<210> 5		
<211> 1143		50

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(1134)  
 <223> DNA insert encoding rat IL13, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region  
 <400> 5

```

gaattcattt aa atg gca ctc tgg gtg act gca gtc ctg gct ctc gct tgc      51
      Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys      10
          1              5              10
ctt ggt ggt ctt gcc acc cca ggg cca gtg cgg aga tcc aca tct ccc      99
Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Gly Pro Val Arg Arg Ser Thr Ser Pro
      15              20              25
cct gtg gcc ctc agg gag ctt atc gag gag ctg agc aac atc aca caa      147
Pro Val Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln
      30              35              40              45
gac cag aag act tcc ctg tgc aac agc agc atg gta tgg agc gtg gac      195
Asp Gln Lys Thr Ser Leu Cys Asn Ser Ser Met Val Trp Ser Val Asp
          50              55              60      20
ctg aca gct ggc ggg ttc tgt gca gcc ctg gaa tcc ctg acc aac atc      243
Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile
          65              70              75
tcc agt tgc aat gcc atc cac agg acc cag agg ata ttg aat ggc ctc      291
Ser Ser Cys Asn Ala Ile His Arg Thr Gln Arg Ile Leu Asn Gly Leu
          80              85              90
tgt aac caa aag gcc tcg gat gtg gct tcc agc ccc cca gat acc aaa      339
Cys Asn Gln Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Ser Pro Pro Asp Thr Lys
          95              100             105
atc gaa gta gcc cag ttt ata tca aaa ctg ctc aat tac tcc aag caa      387
Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln      30
      110             115             120             125
ctt ttc cgc tat ggc cac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt      435
Leu Phe Arg Tyr Gly His Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly
          130             135             140
gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc      483
Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe
          145             150             155
atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct      531
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro      40
          160             165             170
aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc      579
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val
          175             180             185
cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act      627
His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
          190             195             200             205
cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa      675
Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
          210             215             220      50
  
```

ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc 723  
 Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys  
                   225                                  230                                  235

aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc 771  
 Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
                   240                                  245                                  250

aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct 819  
 Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro  
                   255                                  260                                  265

acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta 867 10  
 Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val  
 270                                  275                                  280                                  285

aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg 915  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly  
                   290                                  295                                  300

cag cca cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat 963  
 Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp  
                   305                                  310                                  315

ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg 1011  
 Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp 20  
                   320                                  325                                  330

cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac 1059  
 Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
                   335                                  340                                  345

aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa 1107  
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln  
 350                                  355                                  360                                  365

gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 1143  
 Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
                   370

<210> 6  
 <211> 825  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (13)..(816)  
 <223> DNA insert encoding rat signal peptide, rat IgG Fc region and glucagon C1  
 9-29  
 region 40  
 <400> 6

gaattcattt aa atg aag tcc tgc ggc ctg ttc cct ctc atg gtg ctc ctt 51  
                   Met Lys Ser Cys Gly Leu Phe Pro Leu Met Val Leu Leu  
                   1                                  5                                  10

gct ctg ggt gta ctg gca ccc tgg agt gtg gaa gga gcg gcc gcc gtg 99  
 Ala Leu Gly Val Leu Ala Pro Trp Ser Val Glu Gly Ala Ala Ala Val  
                   15                                  20                                  25

ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca 147  
 Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser  
 30                                  35                                  40                                  45

50

gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc	195	
Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu		
50 55 60		
acc atc act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc	243	
Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser		
65 70 75		
cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa	291	
Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu		
80 85 90		
gtc cac aca gct cag act cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act	339	10
Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
95 100 105		
ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat	387	
Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
110 115 120 125		
ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc	435	
Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro		
130 135 140		
atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat	483	20
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His		
145 150 155		
gta tac acc atg tca cct acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc	531	
Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val		
160 165 170		
agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg	579	
Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val		
175 180 185		
gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag gaa aac tac aag aac act cca	627	
Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro		
190 195 200 205		30
cct acg atg gac aca gat ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat	675	
Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn		
210 215 220		
gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg	723	
Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val		
225 230 235		
ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac	771	
Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His		
240 245 250		
tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc	816	40
Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr		
255 260 265		
tgagaattc	825	
<210> 7		
<211> 1284		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<221> CDS		
<222> (13)..(1275)		50

<223> DNA insert encoding rat IL1 receptor antagonist, rat IgG Fc region and glucagon

C19-29 region

<400> 7

gaattcattt aa atg gaa atc tgc tgg gga ccc tac agt cac cta atc tct	51	
Met Glu Ile Cys Trp Gly Pro Tyr Ser His Leu Ile Ser		
1 5 10		
ctc ctt ctc atc ctt ctg ttt cat tca gag gca gcc tgc cgc cct tct	99	
Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe His Ser Glu Ala Ala Cys Arg Pro Ser		
15 20 25		10
ggg aaa aga ccc tgc aag atg caa gcc ttc aga atc tgg gat act aac	147	
Gly Lys Arg Pro Cys Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Thr Asn		
30 35 40 45		
cag aag acc ttt tac ctg aga aac aac cag ctc att gct ggg tac tta	195	
Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Ile Ala Gly Tyr Leu		
50 55 60		
caa gga cca aat atc aaa cta gaa gaa aag ata gac atg gtg cct att	243	
Gln Gly Pro Asn Ile Lys Leu Glu Glu Lys Ile Asp Met Val Pro Ile		
65 70 75		
gac ctt cat agt gtg ttc ttg ggc atc cac ggg ggc aag ctg tgc ctg	291	20
Asp Leu His Ser Val Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Leu Cys Leu		
80 85 90		
tct tgt gcc aag tct gga gat gat atc aag ctc cag ctg gag gaa gtt	339	
Ser Cys Ala Lys Ser Gly Asp Asp Ile Lys Leu Gln Leu Glu Glu Val		
95 100 105		
aac atc act gat ctg agc aag aac aaa gaa gaa gac aag cgc ttt acc	387	
Asn Ile Thr Asp Leu Ser Lys Asn Lys Glu Glu Asp Lys Arg Phe Thr		
110 115 120 125		
ttc atc cgc tct gag aaa ggc ccc acc acc agc ttt gag tca gct gcc	435	
Phe Ile Arg Ser Glu Lys Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala		30
130 135 140		
tgt cca gga tgg ttc ctc tgc aca aca cta gag gct gac cgt cct gtg	483	
Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Thr Leu Glu Ala Asp Arg Pro Val		
145 150 155		
agc ctc acc aac aca ccg gaa gag ccc ctt ata gtc acg aag ttc tac	531	
Ser Leu Thr Asn Thr Pro Glu Glu Pro Leu Ile Val Thr Lys Phe Tyr		
160 165 170		
ttc cag gaa gac caa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat	579	
Phe Gln Glu Asp Gln Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp		
175 180 185		40
tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc	627	
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile		
190 195 200 205		
ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag	675	
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys		
210 215 220		
gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat	723	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His		
225 230 235		
ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga	771	50



aaa gaa ctt aga tgt cag tgc ata aag aca tac tcc aaa cct ttc cac 147  
 Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His  
 30 35 40 45  
 ccc aaa ttt atc aaa gaa ctg aga gtg att gag agt gga cca cac tgc 195  
 Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys  
 50 55 60  
 gcc aac aca gaa att att gta aag ctt tct gat gga aga gag ctc tgt 243  
 Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys  
 65 70 75  
 ctg gac ccc aag gaa aac tgg gtg cag agg gtt gtg gag aag ttt ttg 291 10  
 Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu  
 80 85 90  
 aag agg gct gag aat tca gcg gcc gcc ccg ggt aaa gcc caa gat ttt 339  
 Lys Arg Ala Glu Asn Ser Ala Ala Ala Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe  
 95 100 105  
 gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 369  
 Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 110 115  
 <210> 9  
 <211> 45 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29  
 <400> 9  
 gagaattcat ttaaatgaga gcggccgccg tgcccagaaa ctgtg 45  
 <210> 10  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29  
 <400> 10  
 tcaaccactg cacaaaatct tgggctttac ccggagagtg ggagagact 49  
 <210> 11  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29 40  
 <400> 11  
 gagaattcat ttaaatgaga gcggccgccg tgcccagaaa ctgtg 45  
 <210> 12  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29  
 <400> 12  
 gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc 50 50

<210> 13  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29  
 <400> 13  
 gagaattcat ttaaattgatt ctgctgggtg tcctgatg 38

<210> 14  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29  
 <400> 14  
 gcagcatcgc ggccgcttct tctctgtcat catggagaaa 40

<210> 15  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29  
 <400> 15  
 gagaattcat ttaaattggct tgtcttggac tccagagg 38

<210> 16  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29  
 <400> 16  
 gcagcatcgc ggccgcttct gaatctgggc atggttctgg 40

<210> 17  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29  
 <400> 17  
 gagaattcat ttaaattggca ctctgggtga ctgcagtc 38

<210> 18  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29  
 <400> 18  
 gcagcatcgc ggccgcgtgg ccatagcgga aaagttgctt 40  
 <210> 19  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector 10  
 pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29  
 <400> 19  
 gagaattcat ttaaattgaa atctgctggg gaccctac 38  
 <210> 20  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
 pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29 20  
 <400> 20  
 gcagcatcgc ggccgcttgg tcttcctgga agtagaactt 40  
 <210> 21  
 <211> 62  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29  
 <400> 21  
 gagaattcat ttaaattgaga gcggccgccc cgggtaaagc ccaagatttt gtgcagtgg 60 30  
 tg 62  
 <210> 22  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29  
 <400> 22  
 gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc 50  
 <210> 23 40  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29  
 <400> 23  
 gagaattcat ttaaattgact tccaagctgg ccgtggct 38  
 <210> 24  
 <211> 40  
 <212> DNA 50

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29

<400> 24

gcagcatcgc ggccgctgaa ttctcagccc tcttcaaaaa

40

【 1 】

File Name : IFN-rR-IgG-glu19-29
Range : 1 - 1470 Mode : Normal
Codon Table : Universal

EcoRI SwaI IFN yR
5' GAA TTC ATT TAA ATG ATT CTG CTG GTG GTC CTG ATG CTG TCT GCG GAG ATC GGG
M I L L V V L M L S A E I G
AGT GGA GCT TTG ATG AGC ACC GAG GAT CCT AAG CCG CCC TCG GTG CCT GCG CCA
S G A L M S T E D P K P P S V P A P
ACA AAT GGT CTA AIT ACG TCC TAT GAC TTG AAC CCT GTC GTA CAT TGG AAG CAC
T N V L I T S Y D L N P V V H W K H
CAG AAC GTG TCG CAG GCT GCC GTC TTC ACT GTA CAG GTA AAG ATG TAT CCA GAA
Q N V S Q A A V F T V Q V K M Y P E
TAC TGG ACT GAT GCC TGC ACC AAC AIT GCC CAT CAT TAT TGT AAT ATC TAC AAA
Y W T D A C T N I A H H Y C N I Y K
CAC AIT TCC TAT CCT GAC TCA TCT GCC TGG GCC AGA GTT AAG GCC AAG GTT GGA
H I S Y P D S S A W A R V K A K V G
CAA AGA GAA TCT GCC TAT GCG CAG TCA GAA GAG TTT AIT ATG TGC CGA AAG GGG
Q R E S A Y A Q S E E F I M C R K G
AAG GTT GGA CCG CCT GCG CTG GAC ATC GGA AGG AAG GAA GAT CAG CTG AIT GTC
K V G P P G L D I G R K E D Q L I V
CAC ATA TTT CAC CCT AAG GTC AAT GTG AGT CAG GAA ACC ATG TTT GGT GAC GGA
H I F H P K V N V S Q E T M F G D G
AAT ACC TGT TAC ACA TTC GAC TAC ACT GTG TTT GTG AAA CAT TAC AGG AGT GGG
N T C Y T F D Y T V F V K H Y R S G

图1

【 2 】

549 558 567 576 585 594
GAG ATC CTA CAT ACA GAA CAT AGC GTC CTA AAA GAA GAT TGT AGC GAA ACT CTG
E I L H T E H S V L K E D C S E T L
603 612 621 630 639 648
TGT GAG TTA AAC ATC TCA GTG TCC ACG CTG AAT TCC AAT TAC TGT GAT TCA GTA
C E L N I S V S T L N S N Y C V S V
657 666 675 684 693 702
GTT GGA AAG TCG TCT TTC TGG CAA GTT AAT ACA GAA ACA TCA AAA GAC GCC TGT
V G K S S F W Q V N T E T S K D A C
IFN yR NotI IgG
711 720 729 738 747 756
ATC CCC TTT CTC CAT GAT GAC AGA GAA GCG GCC GCC GTG CCC AGA AAC TGT
I P F L H D D R E E A A A V P R N C
765 774 783 792 801 810
GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC
G G D C K P C I C T G S E V S S V F
819 828 837 846 855 864
ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC
I F P P K P K D V L T I T L T P K V
873 882 891 900 909 918
ACG TGT GAT GTG GTA GAC AIT AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG
T C V V V D I S Q D D P E V H F S W
927 936 945 954 963 972
TTT GTA GAT GAC GTG GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CGA CCA CCA GAG GAC CAG
F V D D V E V H T A Q T R P P E E Q
981 990 999 1008 1017 1026
TTC AAC AGC ACT TTC CCG TCA GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG
F N S T F R S V S E L P I L H Q D W
1035 1044 1053 1062 1071 1080
CTC AAT GGC AGG ACG TTC AGA TGC AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC CCC
L N G R T F R C K V T S A A P P S P

图2



【 7 】

File Name : CTLA4-IgG- gh19-29
Range : 1 - 1233 Mode : Normal
Codon Table : Universal

EcoRI SmaI ← CTLA4
5' GAA TTC ATT TAA ATG GCT TGT CTT GGA CTC CAG AGG TAC AAA ACT CAC CTG CAG
M A C L G L Q R Y K T H L Q
...
V G M G N G T Q I Y V I D P E P C P

図7

【 9 】

1035 1044 1053 1062 1071 1080
AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC TTC CTC TAC AGC AAG CTC
N T P P T M D T D G S Y F L Y S K L
...
K A Q D F V Q W L M N T \*

図9

【 8 】

CTLA4 → NotI ← IgG

495 504 513 522 531 540
GAT TCA GAC GCG GCC OCC GTG OCC AGA AAC TGT GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT
D S D A A A V P R N C G G D C K P C
...
P D I Y V E W Q M N G Q P Q E N Y K

図8

【 10 】

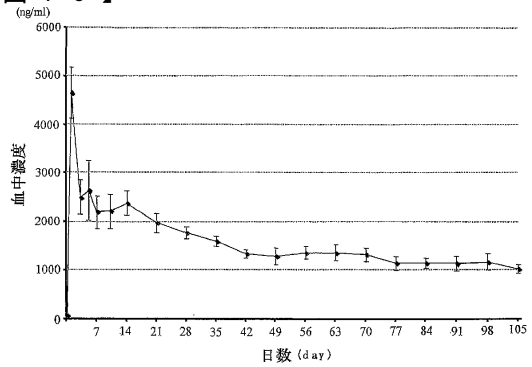


図10

【 11 】

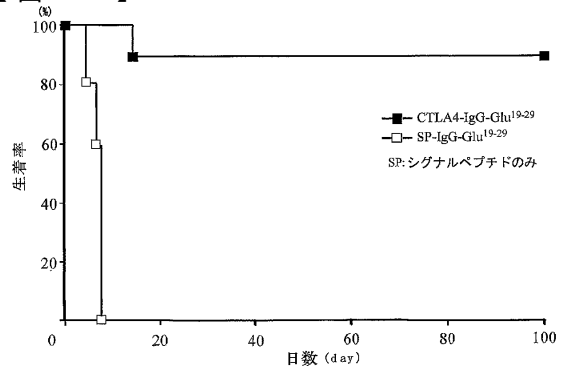


図11

【 1 2 】

File Name : IL13-IgG-glu19-29
Range : 1 - 1143 Mode : Normal
Codon Table : Universal

EcoRI SwaI IL-13
5' GAA TTC ATT TAA ATG GCA CTC TGG GTG ACT GCA GTC CTG GCT CTC GCT TGC CTT
M A L W V T A V L A L A C L
GGT GGT CTT GCC ACC CCA GGG CCA GTG CGG AGA TCC ACA TCT OCC CCT GTG GCC
G G L A T P G P V R R S T S P P V A
CTC AGG GAG CTT ATC GAG GAG CTG AGC AAC ATC ACA CAA GAC CAG AAG ACT TCC
L R E L I E E L S N I T Q D Q K T S
CTG TGC AAC AGC AGC ATG GTA TGG AGC GTG GAC CTG ACA GCT GGC GGG TTC TGT
L C N S S M V W S V D L T A G G F C
GCA GCC CTG GAA TCC CTG ACC AAC ATC TCC AGT TGC AAT GCC ATC CAC AGG ACC
A A L E S L T N I S S C N A I H R T
CMG AGG AAT TTG AAT GGC CTC TGT AAC CAA AAG GCC TCG GAT GTG GCT TCC AGC
Q R I L N G L C N Q K A S D V A S S
CCC CCA GAT ACC AAA ATC GAA GTA GCC CAG TTT ATA TCA AAA CTG CTC AAT TAC
P P D T K I E V A Q F I S K L L N Y
IL-13 NotI IgG
TCC AAG CAA CTT TTC GGC TAT GGC CAC GCG GCC GCC GTG CCC AGA AAC TGT GGA
S K Q L F R Y G H A A A V P R N C G
GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC
G D C K P C I C T G S E V S S V F I

图 12

【 1 4 】

IgG glucagon 19-29
1089 1098 1107 1116 1125 1134
CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG AAT ACC
L S H S P G K A Q D F V Q W L M N T
EcoRI
1143
TGA GAA TTC 3'

图 14

【 1 3 】

495 504 513 522 531 540
TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC ACG
F P P K P K D V L T I T L T P K V T
549 558 567 576 585 594
TGT GTT GTG GTA GAC AAT AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG TTT
C V V V D I S Q D D P E V H F S W F
603 612 621 630 639 648
GTA GAT GAC GTG GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CGA CCA CCA GAG GAG CAG TTC
V D D V E V H T A Q T R P P E E Q F
657 666 675 684 693 702
AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG CTC
N S T F R S V S E L P I L H Q D W L
711 720 729 738 747 756
AAT GGC AGG ACG TTC AGA TGC AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC CCC ATC
N G R T F R C K V T S A A F P S P I
765 774 783 792 801 810
CAG AAA ACC ATC TCC AAA CCC GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC ACC
E K T I S K P E G R T Q V P H V Y T
819 828 837 846 855 864
ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATG ACC TCC ATG
M S P T K E E M T Q N E V S I T C M
873 882 891 900 909 918
GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA GAC AAT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAG GCG CAG
V K G F Y P P D I Y V E W Q M N G Q
927 936 945 954 963 972
CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC
P Q E N Y K N T P P T M D T D G S Y
981 990 999 1008 1017 1026
TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GAA AAC ACG
F L Y S K L N V K K E K W Q Q G N T
1035 1044 1053 1062 1071 1080
TTC ACG TGT TCT GTG CTG CAT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGT
F T C S V L H E G L H N H H T E K S

图 13

【 1 5 】

File Name : SP-IgG-glu-19-29
Range : 1 - 825 Mode : Normal
Codon Table : Universal
EcoRI SwaI Signal peptide of SLPI
9 18 27 36 45 54
5' GAA TTC ATT TAA ATG AAG TCC TGC GGC CTG TTC CCT CTC ATG GTG CTC CTT GCT
M K S C G L F P L M V L L A
Signal peptide of SLPI NotI IgG
63 72 81 90 99 108
CTG GGT GTA CTG GCA CCC TGG AGT GTG GAA GGA GGG GCC GCC GTG CCC AGA AAC
L G V L A P W S V E G A A A V P R N
117 126 135 144 153 162
TGT GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC
C G G D C K P C I C T G S E V S S V
171 180 189 198 207 216
TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG
F I F P P K P K D V L T I T L T P K
225 234 243 252 261 270
GTC ACG TGT GTT GTG GTA GAC AAT AGC CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC
V T C V V V D I S Q D D P E V H F S
279 288 297 306 315 324
TGG TTT GTA GAT GAC GTG GAA GTC CAC ACA GCT CAG ACT CCA CCA CCA GAG GAG
W F V D D V E V H T A Q T R P P E E
333 342 351 360 369 378
CAG TTC AAC AGC ACT TTC GGC TCA GTC AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC
Q F N S T P R S V S E L P I L H Q D
387 396 405 414 423 432
TGG CTC AAT GGC AGG ACG TTC AGA TGC AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TCC
W L N G R T F R C K V T S A A F P S
441 450 459 468 477 486
CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA CCC GAA GGC AGA ACA CAA GAT CCG CAT GTA
P I E K T I S K P E G R T Q V P H V

图 15

【 16 】

```

495      504      513      522      531      540
TAC ACC ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC
-----
Y T M S P T K E E M T Q N E V S I T

549      558      567      576      585      594
TGC ATG GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC
-----
C M V K G F Y P P D I Y V E W Q M N

603      612      621      630      639      648
GGG CAG CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG
-----
G Q P Q E N Y K N T P P T M D T D G

657      666      675      684      693      702
AGT TAC TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA
-----
S Y F L Y S K L N V K K E K W Q Q G

711      720      729      738      747      756
AAC ACG TTC ACG TGT TCT GIG CTG CAT GAA GGC CTG CAC AAC CAC CAT ACT GAG
-----
N T F T C S V L H E G L H N H H T E

          IgG  ←→ glucagon 19-29

765      774      783      792      801      810
AAG AGT CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG
-----
K S L S H S P G K A Q D F V Q W L M

→

819
AAT ACC TGA GAA TTC 3'
-----
N T *

```

图 16

【 19 】

File Name : IL1RA-IgG-glu19-29  
Range : 1 - 1284 Mode : Normal  
Codon Table : Universal

```

RcoRI      SmaI ← IL-1RA
          9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG GAA ATC TGC TGG GAA CCC TAC AGT CAC CTA ATC TCT CTC
-----
M E I C W G P Y S H L I S L

63      72      81      90      99      108
CIT CTC ATC CTT CTG TTT CAT TCA GAG GCA GCC TGC CSC CCT TCT GGG AAA AGA
-----
L L I L L F H S E A A C R P S G K R

117      126      135      144      153      162
CCC TGC AAG ATG CAA GCC TTC AGA ATC TGG GAT ACT AAC CAG AAG ACC TTT TAC
-----
P C K M Q A F R I W D T N Q K T F Y

171      180      189      198      207      216
CTG AGA AAC AAC CAG CTC AIT GCT GGG TAC TTA CAA GGA CCA AAT ATC AAA CTA
-----
L R N N Q L I A G Y L Q G P N I K L

225      234      243      252      261      270
GAA GAA AAG ATA GAC ATG GTG CCT ATT GAC CTT CAT AGT GTG TTC TTG GGC ATC
-----
E E K I D M V P I D L H S V P L G I

279      288      297      306      315      324
CAC GGG GGC AAG CTG TGC CTG TCT TGT GGC AAG TCT GAA GAT GAT ATC AAG CTC
-----
H G G K L C L S C A K S G D D I K L

333      342      351      360      369      378
CAG CTG GAG GAA GTT AAC ATC ACT GAT CTG AGC AAG AAC AAA GAA GAA GAC AAG
-----
Q L E E V N I T D L S K N K E E D K

387      396      405      414      423      432
CGC TTT ACC TTC ATC CCG TCT GAG AAA GGC CCC ACC ACC AGC TTT GAG TCA GCT
-----
R F T F I R S E K G P T T S F E S A

441      450      459      468      477      486
GCC TGT CCA GGA TGG TTC CTC TGC ACA ACA CTA GAG GCT GAC CGT CCT GTG AGC
-----
A C F G W F L C T T L E A D R F V S

```

图 19

【 17 】

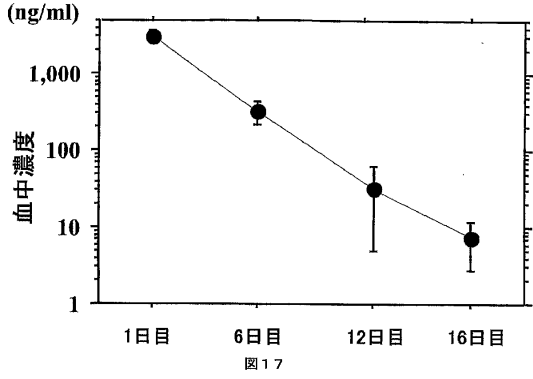


图 17

【 18 】

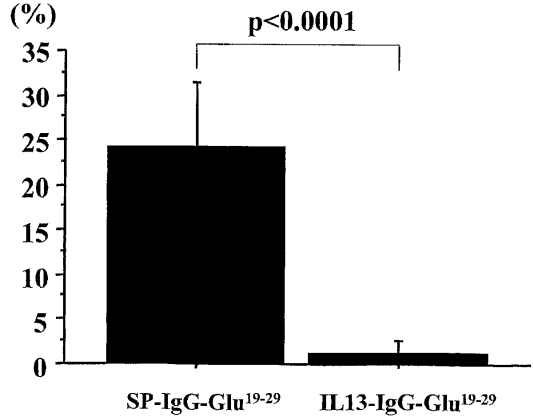


图 18

【 20 】

```

IL-1RA
495      504      513      522      531      540
CTC ACC AAC ACA CCG GAA GAG CCC CTT ATA GTC ACG AAG TTC TAC TTC CAG GAA
-----
L T N T P E E P L I V T K P Y F Q E

          NotI ← IgG

549      558      567      576      585      594
GAC CAA GCG GCC GCC GTG CCC AGA AAC TGT GGA GGT GAT TGC AAG CCT TGT ATA
-----
D Q A A A V P R N C G G D C K P C I

603      612      621      630      639      648
TGT ACA GGC TCA GAA GTA TCA TCT GTC TTC ATC TTC CCC CCA AAG CCC AAA GAT
-----
C T G S E V S S V F I F P P K P K D

657      666      675      684      693      702
GTG CTC ACC ATC ACT CTG ACT CCT AAG GTC ACG TGT GTT GTG GTA GAC AAT ACC
-----
V L T I T L T P K V T C V V V D I S

711      720      729      738      747      756
CAG GAC GAT CCC GAG GTC CAT TTC AGC TGG TTT GTA GAT GAC GAT GAA GTC CAC
-----
Q D D P E V H F S W F V D D V E V H

765      774      783      792      801      810
ACA GCT CAG ACT CGA CCA CCA GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACT TTC CGC TCA GTC
-----
T A Q T R P P E E Q F N S T F R S V

819      828      837      846      855      864
AGT GAA CTC CCC ATC CTG CAC CAG GAC TGG CTC AAT GGC AAG ACG TTC AGA TGC
-----
S E L P I L H Q D W L N G R T F R C

873      882      891      900      909      918
AAG GTC ACC AGT GCA GCT TTC CCA TOC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TOC AAA CCC
-----
K V T S A A F P S P I E K T I S K P

927      936      945      954      963      972
GAA GGC AGA ACA CAA GTT CCG CAT GTA TAC ACC ATG TCA CCT ACC AAG GAA GAG
-----
E G R T Q V P H V Y T M S P T K E E

981      990      999      1008      1017      1025
ATG ACC CAG AAT GAA GTC AGT ATC ACC TGC ATG GTA AAA GGC TTC TAT CCC CCA
-----
M T Q N E V S I T C M V K G F Y P P

```

图 20

【 2 1 】

```

      1035      1044      1053      1062      1071      1080
GAC ATT TAT GTG GAG TGG CAG ATG AAC GGG CAG CCA CAG GAA AAC TAC AAG AAC
D I Y V E W Q M N G Q P Q E N Y K N

      1089      1098      1107      1116      1125      1134
ACT CCA CCT ACG ATG GAC ACA GAT GGG AGT TAC TTC CTC TAC AGC AAG CTC AAT
T P P T M D T D G S Y F L Y S K L N

      1143      1152      1161      1170      1179      1188
GTG AAG AAG GAA AAA TGG CAG CAG GGA AAC ACG TTC ACG TGT TCT GTG CTG CAT
V K K E K W Q Q G N T F T C S V L H

                                IgG →
      1197      1206      1215      1224      1233      1242
GAA GGC CIG CAC AAC CAC CAT ACT GAG AAG AGT CTC TCC CAC TCT CCG GGT AAA
E G L H N H H T E K S L S H S P G K

← glucagon 19-29 →
      1251      1260      1269      1278
GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG AAT ACC TGA GAA TTC 3'
A Q D F V Q W L M N T *

```

図 2 1

【 2 4 】

```

File Name : IL8-glu 19-29
Range : 1 - 369 Mode : Normal
Codon Table : Universal

      EcoRI   SmaI   ←   IL-8
      9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC AAT TAA ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT CTC TTG GCA GCC TTC CTG
M T S K L A V A L L A A F L

      63      72      81      90      99
AAT TCT GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA GTT TTG CCA AGG AGT GCT AAA GAA CTT
I S A A L C E G A V L P R S A K E L

      117      126      135      144      153      162
AGA TGT CAG TGC ATA AAG ACA TAC TCC AAA CCT TTC CAC CCC AAA TTT ATC AAA
R C Q C I K T Y S K P F H P K F I K

      171      180      189      198      207      216
GAA CTG AGA GTG AIT GAG AGT GGA CCA CAC TGC GCC AAC ACA GAA AIT AIT GTA
E L R V I E S G P H C A N T E I I V

      225      234      243      252      261      270
AAG CTT TCT GAT GGA AGA GAG CTC TGT CTG GAC CCC AAG GAA AAC TGG GTG CAG
K L S D G R E L C L D P K E N W V Q

                                IL-3   →   NotI
      279      288      297      306      315      324
AGG GTT GTG GAG AAG TTT TTG AAG AGG GCT GAG AAT TCA GCG GCC GCC CCG GGT
R V V E K F L K R A E N S A A A P G

← glucagon 19-29   →   EcoRI
      333      342      351      360      369
AAA GCC CAA GAT TTT GTG CAG TGG TTG ATG AAT ACC TGA GAA TTC 3'
K A Q D F V Q W L M N T *

```

図 2 4

【 2 2 】

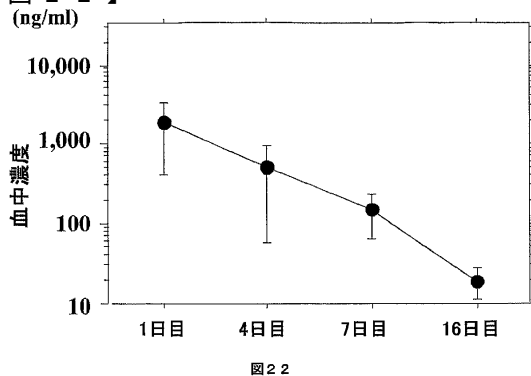


図 2 2

【 2 3 】

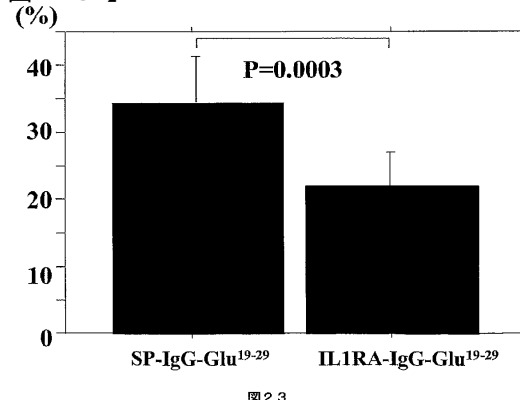


図 2 3

【 2 5 】

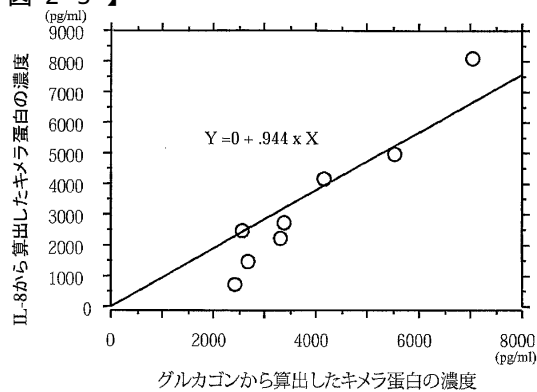


図 2 5

---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

(56) 参考文献 特開昭 5 5 - 0 3 9 7 0 2 ( J P , A )  
NAYLOR, L.H. , Reporter gene technology: the future looks bright, , Biochem Pharmacol ,  
1 9 9 9 年 , Vol.58, No.5, p.749-57

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
A61K 48/00

专利名称(译)	用于基因治疗的载体和用于测定具有基因治疗载体的哺乳动物或细胞中靶蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP3974619B2</a>	公开(公告)日	2007-09-12
申请号	JP2004566302	申请日	2003-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	有限公司新泻TLO		
申请(专利权)人(译)	有限公司新泻TLO		
当前申请(专利权)人(译)	有限公司新泻TLO		
[标]发明人	埴晴雄		
发明人	埴 晴雄		
IPC分类号	A61K48/00 G01N33/53 A61K38/00 A61K31/7088 A61P43/00 C12N15/09 A61K47/48 C12N15/16 C12N15/85		
CPC分类号	C12N15/85 A61K31/7088 A61K47/64 A61K48/00 A61K48/005 C12N2800/108 C12N2830/42 G01N2333/605		
FI分类号	A61K48/00 G01N33/53.D A61K37/02 A61K31/7088 A61P43/00 C12N15/00.ZNA.A		
代理人(译)	谷川荣次郎		
优先权	2003003967 2003-01-10 JP		
其他公开文献	JPWO2004062693A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

所需蛋白质的基因进行治疗时血液水平可以监测更为敏感，并标记肽不是在许多动物的免疫原性，而不必生理作用，基因治疗载体已被公开那里。基因治疗载体，用于哺乳动物细胞的表达载体，结合胰高血糖素的C-末端19-29个氨基酸的肽区域，以在体内产生的核酸编码靶蛋白区域的融合蛋白有一个结构。